

OPTIMASI DAN EVALUASI METODE KRIOPRESERVASI PURWOCENG

Optimization and Evaluation of Cryopreservation Method of Pruatjan

IKA ROOSTIKA¹⁾, IRENG DARWATI²⁾, dan RITA MEGIA³⁾

¹⁾ **Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar 3A Bogor, 16111**

²⁾ **Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar 3, Bogor 16111**

³⁾ **Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Kampus IPB Dramaga, Bogor**

e-mail: ikatambunan@yahoo.com

(Diterima Tgl. 29-7-2013 - Disetujui Tgl. 19-9-2013)

ABSTRAK

Optimasi dan evaluasi metode kriopreservasi perlu dilakukan dalam menentukan protokol standar untuk penyimpanan jangka panjang biakan purwoceng. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi perlakuan pratumbuh, prakultur, dan formulasi media pemulih terhadap daya tumbuh dan daya regenerasi tunas *in vitro* dan kalus embriogenik serta untuk mengevaluasi metode kriopreservasi melalui observasi morfologi, anatomi, dan sitologi. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan BB Litbang Biogen pada tahun 2008-2009. Teknik kriopreservasi yang digunakan adalah vitrifikasi (untuk apeks) dan enkapsulasi-vitrifikasi (untuk kalus embriogenik). Pada teknik vitrifikasi, tunas pucuk diberi perlakuan pratumbuh dengan sukrosa (3, 4, 5, dan 6%) selama 1 dan 2 minggu, perlakuan prakultur dilakukan pada media yang mengandung sukrosa 0,3 M selama 1 dan 3 hari, perlakuan dehidrasi dengan PVS2 diberikan selama 15 dan 30 menit, dan media pemulih yang diujikan adalah media dasar MS atau DKW dengan dan tanpa penambahan adenin sulfat 20 ppm. Pada teknik enkapsulasi-vitrifikasi, kalus embriogenik dienkapsulasi terlebih dahulu dengan Na-alginat 3%, perlakuan dehidrasi dengan PVS2 diberikan selama 0, 30, dan 60 menit. Evaluasi metode teknik kriopreservasi dilakukan melalui pengamatan morfologi secara visual, anatomi meristem dengan *scanning electron microscope* (SEM), pengujian viabilitas dengan *fluorescein diacetate* (FDA), dan analisis ploidi secara *flowcytometry*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik enkapsulasi-vitrifikasi lebih baik daripada teknik vitrifikasi untuk kriopreservasi purwoceng. Walaupun persentase keberhasilan kriopreservasi rendah (10%), kalus embriogenik purwoceng mampu berproliferasi dan beregenerasi menjadi ribuan embrio somatik dewasa. Evaluasi metode kriopreservasi dengan SEM dan FDA dapat diterapkan untuk memperkirakan keberhasilan teknik kriopreservasi secara dini sedangkan analisis *flowcytometry* dapat diterapkan untuk menguji stabilitas genetik bahan tanaman pasca-kriopreservasi.

Kata kunci: *Pimpinella pruatjan* Molk., kriopreservasi, SEM, FDA, *flowcytometry*

ABSTRACT

Optimization and evaluation of cryopreservation methods should be conducted to obtain standard protocol for long term conservation of pruatjan. The objective of this study was to evaluate the effect of combined treatments of pregrowth, preculture, and recovery media to the survival and regeneration rate of *in vitro* shoots and embryogenic calli and to evaluate the cryopreservation methods by observing the morphological, anatomical, and cytological characters. The techniques of vitrification (for apex) and encapsulation-vitrification (for embryogenic calli) were applied in this study. On vitrification technique, the apical shoots were pregrown

on media containing of 3, 4, 5, and 6% sucrose for 1 and 2 weeks, precultured on media containing of 0,3 M sucrose for 1 and 3 days, dehydrated by PVS2 solution for 15 and 30 minutes, and planted on recovery media (MS or DKW basal media supplemented with 20 ppm adenine sulphate). On encapsulation-vitrification technique, embryogenic calli were encapsulated by 3% Na-alginate, dehydrated by PVS2 solution for 0, 30, and 60 minutes. The evaluation of cryopreservation methods was done through visual observation, SEM analysis, viability test, and *flowcytometry* determination. The result showed that encapsulation-vitrification was better than vitrification technique for cryopreservation of pruatjan. The successful rate of this method was low (10%) but the embryogenic calli could proliferate and regenerate into thousands mature somatic embryos. The evaluation by SEM and FDA can be applied as early detection to estimate the successful of cryopreservation, whereas *flowcytometry* analysis may determine the genetic stability of cryopreserved materials.

Key words: *Pimpinella pruatjan* Molk., cryopreservation, SEM, FDA, *flowcytometry*

PENDAHULUAN

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) merupakan tanaman berkhasiat obat sebagai afrodisiak, diuretik, dan tonik. Tanaman tersebut dikategorikan kritis (*endangered*) atau hampir punah dan sangat dilindungi (RIVAI *et al.*, 1992). Dengan mempertimbangkan segala kendala yang dihadapi pada konservasi *ex situ* di lapang (hilangnya genotipe oleh karena cekaman biotik dan abiotik serta perlunya area, tenaga, waktu, dan biaya yang besar) maka disarankan untuk menerapkan teknologi konservasi *in vitro*, khususnya secara kriopreservasi (ROOSTIKA *et al.*, 2007; KELLER *et al.*, 2012).

Koleksi tanaman yang disimpan secara kriopreservasi pada umumnya ditujukan sebagai koleksi dasar. Dewasa ini, aplikasi metode kriopreservasi semakin berkembang ke arah penyimpanan aktif, khususnya untuk bahan tanaman yang akan dimanfaatkan sebagai bahan tanaman dalam kegiatan rekayasa genetika, terutama materi tanaman yang berupa kalus embriogenik (PANIS dan THINH, 2009). Beberapa hal yang menyebabkan kriopreservasi kalus embriogenik menjadi penting dilakukan adalah (1) inisiasi

kalus embriogenik memerlukan waktu yang lama, (2) tindakan subkultur yang frekuentif akan beresiko terhadap perubahan genetik, dan (3) periode *in vitro* yang lama akan menurunkan kemampuan morfogenetik kalus embriogenik (PANIS dan THINH, 2009; SANCHEZ-ROMERO *et al.*, 2009; SALAJ *et al.*, 2012).

Dua macam teknik kriopreservasi biakan purwoceng telah diteliti, yaitu secara vitrifikasi (ROOSTIKA *et al.*, 2007) dan enkapsulasi-vitrifikasi (ROOSTIKA *et al.*, 2008). Optimasi metode kriopreservasi melalui modifikasi perlakuan pratumbuh, prakultur, dan media pemulih diduga dapat meningkatkan keberhasilan kriopreservasi purwoceng (ROOSTIKA *et al.*, 2007). Selain itu, pengujian stabilitas genetik juga perlu dilakukan, sebagaimana disarankan oleh ROOSTIKA dan MARISKA (2004), karena perubahan materi yang disimpan sangat tidak dikehendaki dalam konservasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan evaluasi metode kriopreservasi untuk memperoleh protokol standar yang akan diaplikasikan di bank gen. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kombinasi perlakuan pratumbuh, prakultur, dan formulasi media pemulih terhadap daya hidup dan daya regenerasi tunas pucuk dan kalus embriogenik serta mengevaluasi metode kriopreservasi secara vitrifikasi dan enkapsulasi-vitrifikasi melalui observasi morfologi, anatomi, dan sitologi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian pada tahun 2008-2009. Bahan tanaman adalah biakan purwoceng. Metode kriopreservasi yang digunakan adalah teknik vitrifikasi (untuk apeks) dan enkapsulasi-vitrifikasi (untuk kalus embriogenik). Tahapan kriopreservasi meliputi pratumbuh (*pregrowth*), prakultur (*preculture*), pemuatan (*loading*) dehidrasi (*dehydration*), pembekuan (*freezing*), pelelehan (*thawing*), penggantian muatan (*unloading/deloading*), pemulihan (*recovery*), dan regenerasi (*regeneration*). Tahapan kriopreservasi ditampilkan pada Gambar 1.

1. Kriopreservasi Tunas Pucuk secara Vitrifikasi

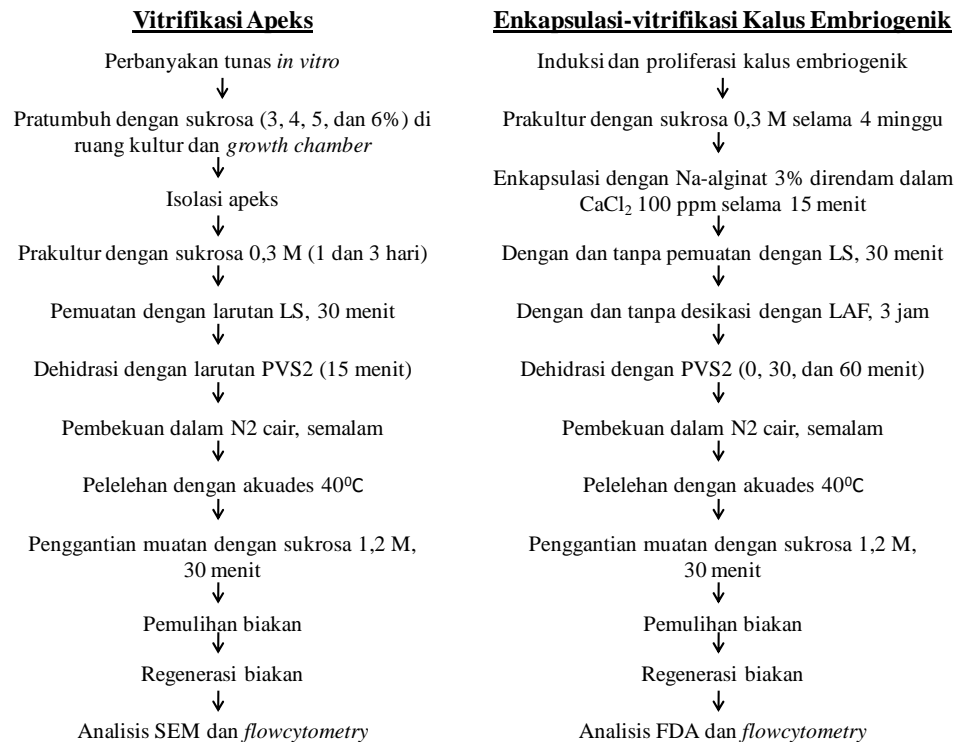
A. Percobaan pratumbuh dan prakultur

Percobaan ini merupakan kombinasi perlakuan taraf sukrosa pada saat pratumbuh (3, 4, 5, dan 6%), periode inkubasi pratumbuh (1 dan 2 minggu), dan kondisi inkubasi

pada saat pratumbuh (di ruang kultur dengan suhu $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ dan fotoperiodisitas 12 jam serta di *growth chamber* dengan suhu 9°C dan fotoperiodisitas 12 jam). Setiap perlakuan terdiri dari tiga ulangan (tabung krio), dan setiap tabung berisi sepuluh eksplan. Pertama-tama, tunas *in vitro* diberi perlakuan pratumbuh kemudian diprakultur. Pada tahap prakultur, apeks yang berukuran 2–3 mm diisolasi dan ditanam pada media DKW dengan penambahan sukrosa 0,3 M dengan masa inkubasi satu dan tiga hari dengan kondisi inkubasi sesuai dengan kondisi pratumbuh sebelumnya. Pemuatan dilakukan dengan menggunakan media DKW dengan penambahan gliserol 2 M dan sukrosa 0,4 M selama 30 menit. Perlakuan dehidrasi dilakukan dengan menggunakan larutan krioprotektan PVS2 (gliserol 30% + *ethylene glycol* (EG) 15% + *dimethyl sulphoxide* (DMSO) 15% + sukrosa 0,4 M dalam media DKW) selama 15 menit. Proses dehidrasi dilakukan dalam tabung krio dan perendaman dalam nitrogen cair (-196°C) dilakukan selama semalam. Pelelehan dilakukan pada suhu 40°C , sedangkan penggantian muatan dilakukan dalam media DKW dengan penambahan sukrosa 1,2 M dengan masa perendaman 30 menit. Setelah perlakuan kriopreservasi lengkap dilakukan, eksplan diinkubasikan dalam keadaan gelap selama dua minggu kemudian diberi pencahayaan 800-1000 lux dengan fotoperiodisitas 16 jam. Biakan ditanam pada media regenerasi (DKW + BA 4 ppm + Thidiazuron (TDZ) 0,4 ppm + Glutamin 100 ppm) (ROOSTIKA *et al.*, 2006; ROOSTIKA *et al.*, 2007). Peubah yang diamati adalah daya hidup dan daya regenerasi, baik sebelum maupun setelah pembekuan dalam nitrogen cair. Data ditampilkan dalam bentuk rerata.

B. Percobaan media pemulih

Percobaan merupakan kombinasi perlakuan pratumbuh (diberi dan tanpa diberi perlakuan pratumbuh dengan sukrosa 6% selama 4 minggu), perlakuan adenin sulfat dalam media pemulih (menggunakan dan tanpa menggunakan adenin sulfat 20 ppm), serta perlakuan jenis media dasar dalam media pemulih (MS dan DKW). Setiap perlakuan diulang sebanyak dua kali (tabung krio), dan setiap tabung berisi 10 eksplan. Kegiatan diawali dengan pemberian perlakuan pratumbuh. Setelah itu, dilakukan tahapan prakultur, pemuatan, dehidrasi, pembekuan, pelelehan, penggantian muatan, dan penanaman biakan pada media pemulih. Peubah yang diamati adalah daya hidup dan daya regenerasi pada periode inkubasi 2 dan 4 minggu. Data ditampilkan dalam bentuk rerata.



Gambar 1. Diagram alir percobaan kriopreservasi apeks dan kalus embriogenik purwoceng dengan teknik vitrifikasi dan enkapsulasi-vitrifikasi

Figure 1. Flow chart of cryopreservation steps of apex and embryogenic calli of puratjan by vitrification and encapsulation-vitrification technique

2. Kriopreservasi Kalus Embriogenik secara Enkapsulasi-vitrifikasi

Pada percobaan ini, kalus embriogenik digunakan sebagai eksplan. Kalus embriogenik diperoleh dari eksplan daun yang ditanam pada media DKW dengan penambahan 2,4-D 2 ppm dan pikloram 0,5 ppm (ROOSTIKA *et al.*, 2008). Percobaan merupakan kombinasi perlakuan prakultur (dengan pemberian dan tanpa pemberian perlakuan prakultur), perlakuan pemuatan (dengan dan tanpa pemuatan), perlakuan desikasi (dengan dan tanpa desikasi), serta perlakuan dehidrasi (dengan durasi 0, 30, dan 60 menit). Setiap perlakuan terdiri dari dua ulangan (tabung krio), dan setiap tabung berisi sepuluh eksplan. Perlakuan prakultur dilakukan dengan menggunakan media DKW yang mengandung sukrosa 0,3 M dengan masa inkubasi selama empat minggu. Setelah prakultur, kalus embriogenik dienkapsulasi dengan Na-alginat 3% (mengandung media DKW dan IBA 5 ppm) dan direndam dalam CaCl_2 100 ppm selama 15 menit. Selanjutnya, pemuatan dilakukan dengan menggunakan larutan *loading solution* (LS) yang merupakan media DKW ditambah dengan gliserol 2 M dan sukrosa 0,4 M dengan durasi perendaman selama 30 menit. Perlakuan desikasi diberikan selama tiga jam dengan menggunakan *blower* dalam

laminair air flow cabinet (LAF). Perlakuan dehidrasi dengan krioprotektan PVS2 diberikan selama 0, 30, dan 60 menit. Setelah itu, kapsul dimasukkan ke dalam tabung krio dan direndam dalam N_2 cair selama semalam. Sebelum ditanam ke media pemulih, kapsul yang masih beku dilelehkan dalam air hangat dengan suhu 40°C sekitar 3 menit. Penggantian muatan dilakukan dengan menggunakan larutan DKW yang ditambah dengan sukrosa 1,2 M dengan durasi rendam selama 30 menit. Peubah yang diamati adalah daya hidup dan daya regenerasi. Data ditampilkan dalam bentuk rerata.

3. Evaluasi Metode Kriopreservasi

Evaluasi metode teknik kriopreservasi dilakukan melalui observasi morfologi dan pertumbuhan biakan. Evaluasi dengan cara tersebut secara otomatis telah dilakukan ketika mengamati respon biakan pasca-perlakuan kriopreservasi. Selain itu, evaluasi juga diterapkan dengan mengamati anatomi meristem melalui analisis SEM, pengujian viabilitas dengan menggunakan FDA, dan determinasi tingkat ploidi secara *flowcytometry*.

A. Analisis SEM

Bahan tanaman yang diamati adalah tunas apikal yang telah diberi perlakuan pratumbuh. Persiapan awal preparasi SEM adalah isolasi apeks yang dilanjutkan dengan pra-fiksasi di dalam larutan glutaraldehyde 2,5% selama 12 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya, dilakukan pencucian dengan larutan bufer *cacodylate* sebanyak 4 kali dengan masing-masing tahap berlangsung selama 15 menit pada suhu 4°C. Pascafiksasi, apeks dimasukkan ke dalam larutan *tanic acid* 1% pada suhu 4°C selama 1 jam. Selanjutnya, sampel dicuci kembali dengan larutan bufer *cacodylate* sebanyak 4 kali dengan masing-masing tahap berlangsung selama 15 menit pada suhu 4°C. Sampel dicuci dengan akuades pada suhu 4°C selama 15 menit. Proses dehidrasi dilakukan dengan larutan seri alkohol 50% sebanyak 4 kali, masing-masing tahapan berlangsung 15 menit pada suhu 4°C. Sampel direndam dalam larutan alkohol 75% selama 20 menit pada suhu 4°C, direndam lagi di dalam larutan alkohol 85% selama 20 menit pada suhu 4°C, kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol 94% selama 20 menit pada suhu kamar. Tahap terakhir adalah perendaman ke dalam larutan alkohol absolut sebanyak 2 kali dengan masing-masing tahapan berlangsung selama 10 menit pada suhu kamar. Untuk preparasi lanjutan sampel SEM, sampel dikeringbekukan (*freeze drying*) dalam larutan t-butanol selama 3 jam setelah terlebih dahulu dimasukkan ke dalam larutan yang sama selama 10 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya, sampel dilekatkan pada *specimen stub* menggunakan perekat karbon, disepuh dengan logam emas, dan diamati dengan SEM. Daya regenerasi apeks ditandai dengan tumbuhnya atau memanjangnya meristem apikal.

B. Pengujian viabilitas

Sampel yang diamati adalah kalus embriogenik yang telah disimpan secara kriopreservasi. Respon yang diamati adalah daya hidup dan daya tumbuh. Pengujian viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan uji FDA (*fluorescein diacetate*). Sepuluh µl stok larutan FDA (3 mg ml⁻¹ FDA dalam aseton) ditambahkan ke dalam 10 ml media cair. Selanjutnya, 1 ml cairan tersebut dicampur dengan 0,5 ml kalus embriogenik. Setelah masa inkubasi lima menit, pengamatan dilakukan di bawah cahaya ultra violet dengan mikroskop Convocal. Viabilitas kalus embriogenik ditandai dengan pendaran fluoresens hijau terang.

C. Determinasi tingkat ploidi

Sampel yang diuji adalah daun dari tunas *in vitro* dan kalus purwoceng yang telah disimpan secara kriopreservasi. Sekitar 1 cm² daun dicacah dengan pisau silet tajam dalam cawan petri yang telah dibasahi dengan 1ml larutan bufer *UV Cystain Ploidy*. Selanjutnya, cairan tersebut disaring dengan Celltrix berukuran 20 µM dan ditampung dalam *cuvette*. Analisis *flowcytometry* dilakukan dengan menggunakan alat *Cell Counter Analysis* (CCA Partec). Pembacaan *peak* dilakukan pada *Gain* 350. Sebagai kontrol, digunakan sampel daun yang berasal dari biakan induk yang tidak diberi perlakuan kriopreservasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kriopreservasi Tunas Pucuk secara Vitrifikasi

A. Pengaruh kombinasi perlakuan pratumbuh dan prakultur

Perlakuan pratumbuh atau prakultur secara tunggal tidak berpengaruh terhadap peningkatan toleransi eksplan terhadap cekaman dehidrasi oleh larutan krioprotektan PVS2. Terdapat kecenderungan adanya pengaruh kombinasi antara perlakuan pratumbuh dan prakultur. Perlakuan pratumbuh di ruang kultur selama 1 minggu yang dikombinasikan dengan perlakuan prakultur dengan sukrosa 6% selama 1 hari atau kombinasi perlakuan antara pratumbuh di ruang kultur selama 2 minggu dan prakultur dengan sukrosa 3% selama 3 hari menghasilkan daya hidup yang tertinggi sebelum pembekuan dalam nitrogen cair. Namun demikian, biakan tersebut tidak bertahan hidup setelah pembekuan dalam nitrogen cair. Eksplan yang bertahan hidup setelah pembekuan dalam nitrogen cair berasal dari perlakuan pratumbuh di *growth chamber* (Tabel 1). Diduga, rendahnya suhu dalam *growth chamber* menyebabkan akumulasi senyawa regulator osmotik sehingga dapat meningkatkan toleransi jaringan terhadap dehidrasi selama tahapan kriopreservasi. Menurut GROUT (1995), perlakuan pratumbuh menyebabkan akumulasi zat terlarut, reduksi isotonik, reduksi volume vakuola, dan perubahan struktur membran dasar.

Tabel 1. Pengaruh kombinasi perlakuan pratumbuh dan prakultur terhadap daya hidup apeks purwoceng 3 minggu masa inkubasi

Table 1. The effect of combined treatments of pregrowth and preculture to the survival rate of pruatjan apex 3 weeks after incubation

Pratumbuh <i>Pregrowth</i>	Sukrosa <i>Sucrose</i> (%)	Prakultur (hari) <i>Preculture (days)</i>	Daya Hidup <i>Survival rate (%)</i>	
			Prapembekuan <i>Prefreezing</i>	Pascapembekuan <i>Postfreezing</i>
Ruang kultur/ <i>Room culture</i>				
1 minggu/ <i>1 week</i>	3	1	55,0	0
	4		35,0	0
	5		28,5	0
	6		71,5	0
2 minggu/ <i>2 week</i>	3	3	70,0	0
	4		65,0	0
	5		55,0	0
	6		47,3	0
<i>Growth chamber</i>				
1 minggu/ <i>1 week</i>	3	1	20,0	0
	4		21,0	10
	5		33,0	5
	6		40,0	0
2 minggu/ <i>2 week</i>	3	3	60,0	0
	4		30,0	0
	5		10,0	10
	6		32,5	0

Keterangan: Apeks purwoceng diberi perlakuan pemuatan dalam larutan LS selama 30 menit dan didehidrasi dengan krioprotektan PVS2 selama 15 menit.

Note : Pruatjan apexes were loaded by LS solution for 30 minutes and dehydrated by PVS2 solution for 15 minutes.

Selain pratumbuh, perlakuan prakultur dengan menggunakan sukrosa dapat meningkatkan fleksibilitas membran sel untuk menghindarkan sel dari plasmolisis yang tidak dapat balik (*irreversible*). Menurut DA SILVA (2004), sukrosa merupakan salah satu jenis gula yang siap dimetabolismekan selain glukosa dan fruktosa sehingga lebih mudah diuraikan di dalam sel tanaman untuk mendukung pertumbuhan kultur. ZHU *et al.* (2006) melaporkan bahwa prakultur dengan menggunakan sukrosa merupakan tahapan penting yang dapat mendukung regenerasi biakan pascakriopreservasi dengan cara meningkatkan kandungan berbagai macam gula (glukosa, fruktosa, sukrosa, rafinosa, stasiosa, inositol, dan sorbitol) dan asam lemak total, serta mengubah rasio sterol. Gula merupakan komponen penting yang berperan dalam osmosis dan reduksi titik beku, memelihara membran bilayer, dan menstabilkan protein selama pembekuan, sedangkan sterol merupakan salah satu komponen penyusun membran sel dan berperan penting dalam stabilisasi dan permeabilitas membran sel. Selain itu, GAMEZ-PASTRANA *et al.* (2011) melaporkan bahwa perlakuan prakultur dapat menurunkan kalori yang dilepas dan suhu pembentukan inti kristal es pada saat pembekuan. Hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan prakultur dapat meningkatkan keberhasilan kriopreservasi.

B. Pengaruh media pemulihan

Penggunaan adenin sulfat 20 ppm berpengaruh positif terhadap pemulihan apeks purwoceng ketika perlakuan pratumbuh tidak diberikan. Sebaliknya, pemberian adenin sulfat tidak dapat meningkatkan daya pemulihan apeks ketika perlakuan pratumbuh diterapkan. Kombinasi perlakuan pratumbuh dan penggunaan adenin sulfat justru menyebabkan rendahnya persentase hidup biakan (Tabel 2). Hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan pratumbuh sudah cukup diterapkan dalam kriopreservasi purwoceng. Adenin sulfat pada umumnya digunakan untuk menstimulasi ketegaran biakan yang telah lama dikulturkan secara *in vitro* sehingga pertumbuhannya diharapkan dapat terpacu. Adenin sulfat merupakan sumber nitrogen yang diduga berguna untuk sintesis DNA, RNA, dan protein yang selanjutnya berperan dalam pembelahan sel. Menurut FUJIKAWA dan JITSUYAMA (2000), di antara beberapa macam mekanisme proteksi, akumulasi karbohidrat terlarut merupakan faktor yang paling kuat untuk menghindarkan sel dari kerusakan pada saat pembekuan. Pertumbuhan apeks pascakriopreservasi secara vitrifikasi ditampilkan pada Gambar 2.

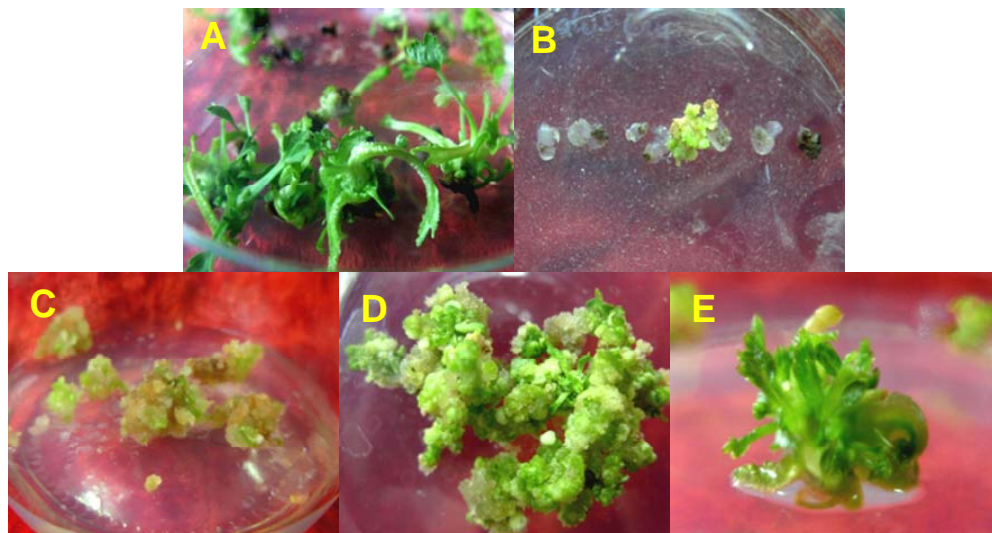
Tabel 2. Pengaruh kombinasi perlakuan pratumbuh dan media pemulihan terhadap biakan tunas *in vitro* purwoceng
 Table 2. The effect of combined treatments of pregrowth and recovery media to the survival rate of pruatjan cultures

Pratumbuh <i>Pregrowth</i>	Media pemulihan <i>Recovery media</i>	Media dasar dalam krioprotektan <i>Basal media of cryoprotectant</i>	Persentase hidup <i>Survival rate (%)</i>	
			2 minggu <i>2 weeks</i>	4 minggu <i>4 weeks</i>
Tanpa <i>Without</i>	Tanpa adenin sulfat 20 ppm <i>Without adenine sulphate 20 ppm</i>	MS	30	30
		DKW	25	25
Dengan <i>With</i>	Tanpa adenin sulfat 20 ppm <i>Without adenine sulphate 20 ppm</i>	MS	0	30
		DKW	30	40
Tanpa <i>Without</i>	Dengan adenin sulfat 20 ppm <i>With adenine sulphate 20 ppm</i>	MS	10	40
		DKW	20	30
Dengan <i>With</i>	Dengan adenin sulfat 20 ppm <i>With adenine sulphate 20 ppm</i>	MS	0	0
		DKW	20	20

2. Kriopreservasi Kalus Embriogenik

Pada teknik enkapsulasi-vitrifikasi kalus embriogenik purwoceng, perlakuan pemuatan dengan larutan LS lebih baik daripada tanpa pemuatan. Perlakuan tanpa desikasi lebih baik daripada dengan desikasi karena pemberian

desikasi tidak meningkatkan daya hidup eksplan pasca-kriopreservasi. Dengan demikian, kombinasi perlakuan pemuatan selama 30 menit tanpa desikasi dengan durasi dehidrasi yang minimal (30 menit) merupakan perlakuan yang terbaik (Tabel 3).



Gambar 2. Penampilan apeks dan kalus embriogenik purwoceng pra dan pascakriopreservasi: (A) perlakuan kontrol pratumbuh dari apeks, (B) pasca pembekuan kalus embriogenik dalam nitrogen cair, (C) pembentukan embrio sekunder, (D) pendewasaan embrio somatik, dan (E) elongasi embrio somatik

Figure 2. Performance of apex and embryogenic calli of pruatjan pre and postcryopreservation: (A) control treatment of apex, (B) postfreezing of embryogenic calli, (C) secondary somatic embryo formation, (D) somatic embryo maturation, and (E) somatic embryo elongation

Tabel 3. Pengaruh perlakuan prakultur, pemuatan, dan desikasi terhadap daya hidup kalus embriogenik purwoceng
 Table 3. The effect of preculture, loading, and dessication to the survival rate of embryogenic calli of pruatjan

Prakultur <i>Preculture</i>	Pemuatan <i>Loading</i>	Desikasi <i>Dessication</i>	Dehidrasi <i>Dehydration</i>	Daya hidup <i>Survival</i> (%)
Dengan <i>With</i>	Dengan <i>With</i>	Tanpa <i>Without</i>	0	10
			30	10
			60	10
Dengan <i>With</i>	Tanpa <i>Without</i>	Dengan <i>With</i>	0	10
			30	0
			60	0

Keterangan: Prakultur dilakukan selama 4 minggu, pemuatan selama 30 menit, dan desikasi selama 3 jam.

Note : Preculture was conducted for 4 weeks, loading for 30 minutes, and dessication for 3 hours.

Pada dasarnya, perlakuan desikasi ditujukan untuk menurunkan kandungan air yang terdapat dalam kapsul alginat sehingga diharapkan dapat meningkatkan daya hidup eksplan pascakriopreservasi. Namun demikian, perlakuan desikasi dalam percobaan ini menyebabkan penurunan daya hidup eksplan. Diduga, desikasi menyebabkan turunnya kandungan air secara drastis sehingga menyebabkan kematian jaringan eksplan. Dengan demikian, penurunan kandungan air dalam kapsul alginat lebih baik dilakukan secara dehidrasi dengan larutan krioprotektan PVS2 daripada secara desikasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tingkat keberhasilan kriopreservasi biakan purwoceng masih rendah (10%). Diduga, rendahnya tingkat keberhasilan

tersebut disebabkan oleh beragamnya stadium perkembangan sel-sel embriogenik. Keceragaman bahan tanaman sangat menentukan keberhasilan kriopreservasi, yaitu sel-sel harus berada pada status fisiologis yang sesuai untuk osmotoleransi selama tahapan kriopreservasi (SAKAI, 2000). Sel tanaman yang tumbuh secara eksponensial lebih toleran terhadap pembekuan daripada sel pada fase log atau stasioner (YOSHIDA *et al.*, 1993). Walaupun diperoleh persentase hidup yang rendah pascakriopreservasi, kalus embriogenik mampu berproliferasi dan beregenerasi menjadi ribuan embrio somatik (Gambar 3). Hal ini merupakan salah satu kelebihan dari penggunaan bahan tanaman berupa kalus embriogenik karena daya proliferasinya jauh lebih tinggi daripada tunas *in vitro*.



Gambar 3. Embrio somatik purwoceng yang dihasilkan dari kalus embriogenik pascakriopreservasi secara enkapsulasi-vitrifikasi

Figure 3. Performance of somatic embryo of pruatjan derived from cryopreserved-embryogenic calli by encapsulation-vitrification technique

3. Evaluasi Metode Kriopreservasi

Cara awal yang paling mudah untuk mengevaluasi metode kriopreservasi adalah melalui pengamatan morfologi. Berdasarkan pengamatan morfologi, tidak ditemukan adanya perbedaan morfologi pada biakan purwoceng, baik sebelum maupun setelah kriopreservasi. Untuk mengevaluasi lebih lanjut maka dilakukan analisis SEM, pengujian viabilitas dengan FDA, dan determinasi tingkat ploidi secara *flowcytometry*.

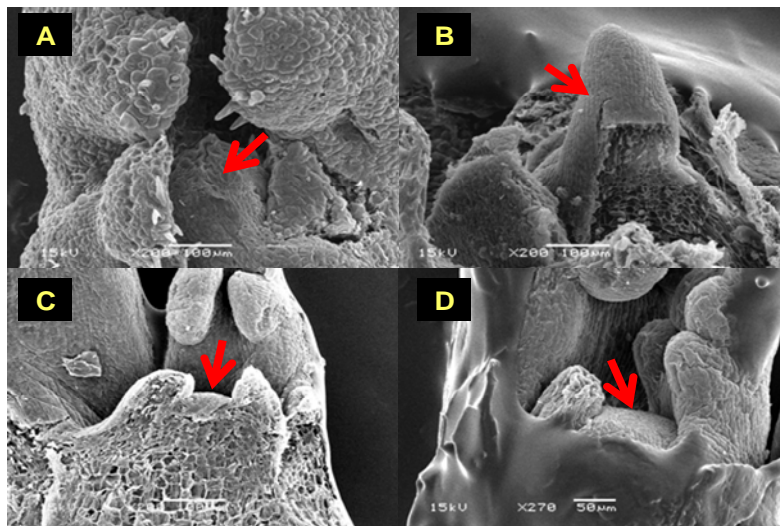
A. Analisis SEM

Hasil pengamatan melalui SEM menunjukkan bahwa tingkat pertumbuhan kultur yang berasal dari perlakuan pratumbuh dengan sukrosa bertaraf tinggi (6%) lebih baik daripada yang berasal dari taraf sukrosa yang lebih rendah. Berdasarkan Gambar 4, daerah *apical dome* dari biakan yang diberi perlakuan pratumbuh 6% tanpa pembekuan mengalami elongasi sedangkan meristem dari biakan yang diberi perlakuan pratumbuh 3% tidak mengalami

pertumbuhan. Namun demikian, meristem yang berasal dari perlakuan pratumbuh pada sukrosa 6% tidak memperlihatkan pertumbuhan pascapembekuan dalam nitrogen cair. Diduga, perlakuan pratumbuh saja tidak cukup meningkatkan toleransi jaringan purwoceng terhadap stres dehidrasi selama kriopreservasi. Selain observasi kecepatan pertumbuhan, analisis secara SEM dilakukan untuk mengevaluasi metode kriopreservasi sebagaimana yang dilakukan oleh LEUNUFNA (2004). Analisis tersebut dapat membantu memprediksi lebih awal tentang keberhasilan dan kegagalan pertumbuhan sehingga dapat membantu upaya pemulihan kultur pascakriopreservasi.

B. Pengujian Viabilitas

Hasil pengamatan bahwa teknik enkapsulasi-vitrifikasi lebih baik daripada teknik vitrifikasi. Pada teknik vitrifikasi, dihasilkan persentase hidup yang lebih tinggi (40%), namun tunas tersebut tidak mampu bertahan hidup lebih lanjut. Sebaliknya, daya hidup kalus embriogenik lebih rendah (10%), namun daya tumbuh eksplan jauh lebih pesat (dengan tingkat proliferasi kalus yang tinggi dan daya regenerasi yang baik).

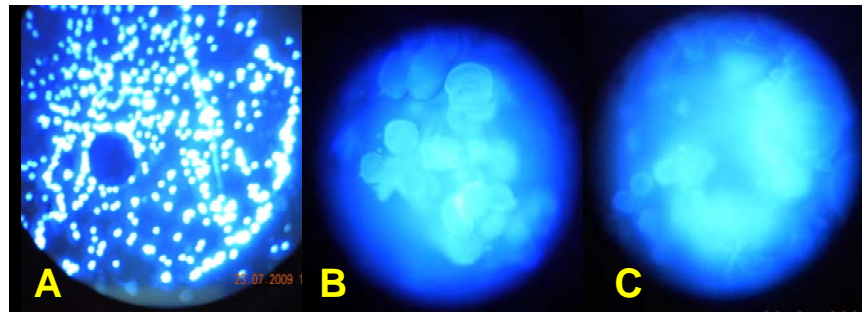


Gambar 4. Analisis struktur morfologi meristem apikal dari apeks purwoceng dengan SEM: (A) pratumbuh sukrosa 3% sebelum pembekuan, (B) pratumbuh sukrosa 6% sebelum pembekuan, (C) pratumbuh sukrosa 3% setelah pembekuan, dan (D) pratumbuh sukrosa 6% setelah pembekuan. Panah menunjukkan daerah *apical dome* dari meristem

Figure 4. The analysis of morphological structure of apical meristem of pruatjan apex by SEM: (A) pregrowth on 3% sucrose before freezing, (B) pregrowth on 6% sucrose before freezing, (C) pregrowth on 3% sucrose after freezing, and (D) pregrowth on 6% sucrose after freezing. The arrow indicated the apical dome of the meristem

Hasil uji FDA menunjukkan bahwa viabilitas sel dari kalus embriogenik tidak berubah, sebelum dan sesudah pembekuan (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa kumpulan sel yang telah didehidrasi masih tetap bertahan hidup, baik pada saat sebelum maupun sesudah pembekuan dalam nitrogen cair. Hasil uji viabilitas sel tersebut

mengkonfirmasi keunggulan kriopreservasi secara enkapsulasi-vitrifikasi kalus embriogenik purwoceng. Dengan menggunakan bahan uji viabilitas sel yang berbeda (*triphenyl tetrazolium chloride*), OZUDOGRU *et al.* (2010) juga mengkonfirmasi viabilitas sel *Fraxinus excelsior* pascakriopreservasi.



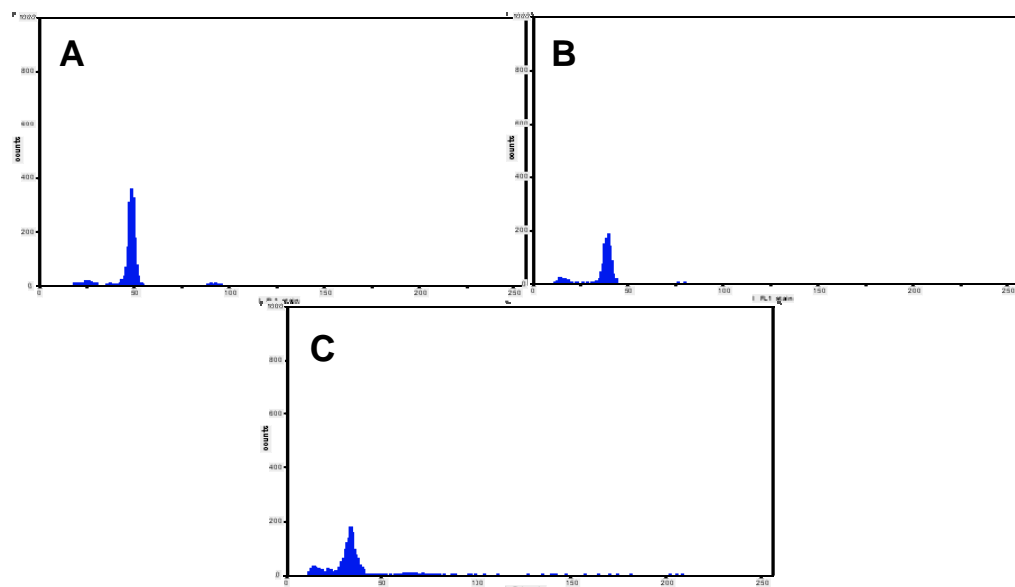
Gambar 5. Hasil pengujian viabilitas kalus embriogenik purwoceng dengan FDA: (A) kontrol/beads, (B) sebelum pembekuan, dan (C) setelah pembekuan

Figure 5. The visualization of viability test of somatic embryogenic calli of pruatjan by using FDA: (A) control/beads, (B) before freezing, and (C) after freezing

C. Determinasi Tingkat Ploidi

Hasil analisis *flowcytometry* menunjukkan bahwa puncak grafik (*peak*) dari biakan pascakriopreservasi menjadi agak bergeser ke kiri dari posisi aksis 50 (Gambar 6). Menurut HAO *et al.* (2002), meskipun pengujian sitologi menemukan adanya variasi pada kromosom stroberi yang disimpan secara kriopreservasi dengan tanaman kontrolnya, analisis AFLP (*Amplified Fragmentation Length Polymorphism*) dengan menggunakan 16 primer membuktikan bahwa kejadian tersebut hanya berupa metilasi DNA. Pola metilasi yang biasa terjadi pada siklus vegetatif awal dan semakin menurun dengan adanya subkultur menandakan bahwa metilasi tersebut merupakan kejadian epigenetik yang bersifat *reversible* (dapat balik) (JOHNSTON *et al.*, 2009) sehingga bukan merupakan perubahan genetik.

Pada kalus embriogenik, tidak ditemukan adanya ploidi yang bercampur (*mixoploid*). Hal ini menunjukkan bahwa kalus tersebut mempunyai komposisi genetik yang relatif sama sehingga tidak mengindikasikan terjadinya variasi somaklonal dan memberikan jaminan adanya stabilitas genetik jaringan yang disimpan secara kriopreservasi. NIINO (1997) mengevaluasi tunas *mulberry*, apel, dan pir yang disimpan secara kriopreservasi selama 3 dan 8 tahun dan membuktikan bahwa planlet yang diperoleh tidak menyimpang secara morfologi dan sitologi (jumlah kromosom). Demikian pula, URBANOVA *et al.* (2002) melaporkan bahwa jumlah kromosom dan aktivitas mitotik meristem *Hypericum perforatum* yang disimpan secara kriopreservasi tidak berbeda nyata dengan kontrol.



Gambar 6. Hasil pengujian tingkat ploidi biakan purwoceng secara *flowcytometry*: (A) kontrol, (B) tunas pascadehidrasi dengan PVS2, dan (C) kalus embriogenik pascakriopreservasi

Figure 6. The result of flowcytometry analysis of pruatjan cultures: (A) control, (B) apeks after dehydration with PVS2 solution, and (C) embryogenic calli after cryopreservation

Evaluasi metode kriopreservasi merupakan tahapan penting yang perlu dilakukan, terutama sebelum aplikasi rutin di bank gen. Evaluasi tersebut dapat dilakukan melalui observasi karakter morfologi, sitologi, dan genetik biakan (SHARMA, 2005; RYNNÄNEN dan ARONEN, 2008).

Pada penelitian ini, berdasarkan evaluasi metode kriopreservasi, dapat dikatakan bahwa teknik enkapsulasi-vitrifikasi lebih efektif diterapkan untuk kriopreservasi tanaman purwoceng dibandingkan dengan teknik vitrifikasi. Pasca kriopreservasi secara enkapsulasi-vitrifikasi, kalus mempunyai tingkat proliferasi dan regenerasi yang tinggi hingga membentuk embrio somatik yang berlimpah (ribuan). Bahan tanaman tersebut akan berguna untuk berbagai macam keperluan, seperti produksi bibit secara masal, produksi metabolit sekunder, rekayasa seluler, dan transformasi genetik.

KESIMPULAN

Teknik enkapsulasi-vitrifikasi kalus embriogenik lebih baik daripada teknik vitrifikasi apeks dalam kriopreservasi purwoceng. Kalus embriogenik purwoceng mampu berproliferasi dan beregenerasi menjadi embrio somatik setelah disimpan secara kriopreservasi. Evaluasi metode kriopreservasi melalui analisis SEM, FDA, dan *flowcytometry* dapat diterapkan untuk menentukan keberhasilan teknik kriopreservasi secara dini dan untuk menentukan metode kriopreservasi yang terbaik untuk diterapkan menjadi protokol standar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Seluruh anggota tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Pertanian (Balitbang Pertanian) yang telah menyediakan dana penelitian ini melalui Program KKP3T 2008-2009.

DAFTAR PUSTAKA

- DA SILVA, J.A.T. 2004. The effect of carbon source on *in vitro* organogenesis Chrysanthemum thin cell layers. *Bragantia* 63(2): 165-177.
- FUJIKAWA, S. and Y. JITSUYAMA. 2000. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification. *Dalam: F. Engelmann and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p. 36-42.
- GAMEZ-PASTRANA, R., M.T. GONZALEZ-ARNAO, and Y. MARTINEZ-OCAMPO. 2011. Thermal events in calcium alginate beads during encapsulation dehydration and encapsulation-vitrification protocols. *Dalam: B. Panis and P. Lynch (Eds.). Proceedings of The First Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species*. ISHS Comission Molecular Biology and In Vitro Culture. Belgium. p. 47-54.
- GROUT, B.W.W. 1995. Introduction to the *in vitro* preservation of plant cells, tissues, and organs. *Dalam: B. Grout (Ed.). Genetic Preservation of Plant Cells In Vitro*. Springer Lab Manual. Berlin-Heidelberg. p. 1-17.
- HAO, Y.J., C.X. YOU, and X.X. DENG. 2002. Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation. *CryoLetters*. 23(1): 37-46 (Abstract).
- JOHNSTON, J.W., E.E. BENSON, and K. HARDING. 2009. Cryopreservation induces temporal DNA methylation epigenetic changes and differential transcriptional activity in Ribes germplasm. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 123-131.
- KELLER, E.R.J., B. PANIS, and F. ENGELMANN. 2012. *In vitro* storage and cryopreservation as substantial complements in concerted actions to better maintain and use crop germplasm. *Acta Hort*. 961: 35-50.
- LEUNUFNA, S. 2004. Improvement of the *in vitro* maintenance and cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.). Dissertation. Martin Luther Universitat Halle, Wittenberg. 120 p.
- NIINO, T. 1997. Cryopreservation of deciduous fruits and mulberry trees. *Dalam: M.K. Razdan and E.C. Cocking (Eds.). Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro*. Science Publishers Inc. USA. p. 196-223.
- OZUDOGRU, E.A., M. CAPUANA, E. KAYA, B. PANIS, and M. LAMBARDI. 2010. Cryopreservation *Offraxis excelsior* L. embryogenic callus by one-step freezing and slow cooling techniques. *CryoLetters*. 31(1): 63-75.
- PANIS, B. and N.T. THINH. 2009. Cryopreservation of *Musa* germplasm. INIBAB Technical Guidelines. 44 p.
- RIVAI, M.A., RUGAYAH, and E.A. WIDJAJA. 1992. Thirty years of the eroded species medicinal crops. *Floribunda. Pioneer of Indonesian Plant Taxonomy*. Bogor. 28 p.
- ROOSTIKA, I. dan I. MARISKA. 2004. Pemanfaatan teknik kriopreservasi dalam penyimpanan plasma nutfah tanaman. *Buletin Plasma Nutfah*. 9(2): 10-18.
- ROOSTIKA, I., R. PURNAMANINGSIH, I. DARWATI, dan I. MARISKA. 2006. Regeneration of *Pimpinella pruatjan* through somatic embryogenesis. *Indonesian Journal of Agricultural Science*. 8(2): 60-66.
- ROOSTIKA, I., R. MEGIA, dan I. DARWATI. 2007. Kriopreservasi tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) dengan teknik vitrifikasi. *Berita Biologi* 8 (6): 429-431.
- ROOSTIKA, I., S. RAHAYU, dan N. SUNARLIM. 2008. Kriopreservasi tanaman obat langka purwoceng

- dengan teknik enkapsulasi-vitrifikasi. Buletin Plasma Nutfah. 14(2): 49-56.
- RYYNÄNEN, L. and T. ARONEN. 2008. Cryopreservation of forest trees—potentials and applications in Metla. *In*: J. Laamanen, M. Uosukainen, H. Häggman, A. Nukari, and S. Rantala (*Eds*). Cryopreservation of Crop Species in Europe. MTT Agrifood Research Finland. p.39-41.
- SAKAI, A. 2000. Development of cryopreservation technique. *Dalam*: F. Engelmann dan H. Takagi (*Eds.*). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research, Progreess and Application. IPGRI. Rome-Italy. p. 1-7.
- SALAJ, T., I.M. IKOVA, R. SWENNEN, B. PANIS, and J. SALAJ. 2012. Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. *Acta Physiol Plant*. 34: 227-233.
- SANCHEZ-ROMERO, C., R. SWENNEN, and B. PANIS. 2009. Cryopreservation of olive embryogenic cultures. *CryoLetters*. 30(5): 359-372.
- SHARMA, S.D. 2005. Cryopreservation of somatic embryos. An overview. *Indian Journal of Biotechnology*. 4: 47-55.
- URBANNOVA, M., E. CELLAROVA, and K. KIMAKOVA. 2002. Chromosome number stability and mitotic activity of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. meristems. *Plant Cell Report*. 20: 1082-1086.
- YOSHIDA, S., Y. HATTANDA, and T. SUYAMA. 1993. Variations in chilling sensivity of suspension cultures cell of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) during the growth cycle. *Plant Cell Physiology* 34:673-679.
- ZHU, G-Y, J.M.C. GEUNS, S. DUSSERT, R. SWENNEN, and B. PANIS. 2006. Change in sugar, sterol, and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation *Physiologia Plantarum*. 128: 80–94.